



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHUNG NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 7/00</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/14231</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. März 1999 (25.03.99)</p>		
<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>197 40 604.1</div> <div>16. September 1997 (16.09.97)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>198 05 385.1</div> <div>11. Februar 1998 (11.02.98)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>197 40 604.1</div> <div>16. September 1997 (16.09.97)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>198 05 385.1</div> <div>11. Februar 1998 (11.02.98)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>197 40 604.1</div> <div>16. September 1997 (16.09.97)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>198 05 385.1</div> <div>11. Februar 1998 (11.02.98)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: BIFIDUS STIMULATING PEPTIDES</p> <p>(54) Bezeichnung: BIFIDOGENE PEPTIDE</p> <p>(57) Abstract</p> <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1; padding-right: 10px;"> <p>The invention relates to peptides which are obtainable by mixing cow milk or human milk with proteases followed by a two hour incubation; centrifugation in order to remove milk fat; acidification to a pH of 2.0 by strong acidulation; separating the precipitated proteins; applying at least one reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) step; applying a cationic exchanger HPLC step; collecting fractions; adjusting the fractions to a salt content < 25 mM for executing an activity test by means of dialysis or reverse phase HPLC; cultivating bifidobacterium and e coli in the presence of the fractions and selection of fractions which satisfy condition BW/B0 - EW/E0 ≥ 0,15, wherein BW denotes the bacterial count which is obtained during a 16-hour incubation of bifidobacterium in 50 % elliker broth in the presence of peptides in a concentration of 200 µg/ml, B0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation, EW denotes the bacterial count which is obtained during 16 hour incubation of e coli in 3 g/l tryptic soy broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml, E0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation; and isolating the available peptide in said fraction. In addition, the amidated, acetylated, sulphatized, phosphorylated, glycosylized, oxidized derivatives or fragments with bifidus stimulating characteristics and peptides are obtainable by combining the peptides, fragments or derivatives by means of chemical bonding.</p> </div> <div style="flex: 1;"> </div> </div>				

(57) Zusammenfassung

Peptide erhältlich durch Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden, Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen, Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren, Abtrennung der ausgefallenen Proteine, Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes, Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes, Sammeln von Fraktionen, Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC, Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung: $BW/B0 - EW/E0 \geq 0,15$ (bifidogen) genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50 % Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird, E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Bifidogene Peptide

Die vorliegende Erfindung betrifft bifidogene Peptide, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der bifidogenen Peptide.

Von Milch ist bekannt, daß sie fördernd auf den Gesundheitszustand von Säuglingen wirkt. Dies wird vielfach auf den Einfluß der Milch auf die Ausbildung einer säuglingstypischen Darmflora zurückgeführt, die zu mehr als 90% aus *Bifidobacterium bifidum* besteht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es Peptide bereitzustellen, die einen positiven Einfluß auf die Darmflora haben.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch Peptide mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Bei den erfindungsgemäßen Peptiden handelt es sich um Peptide, die erhältlich sind durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,

- 2 -

- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

$$\frac{BW}{B0} - \frac{EW}{E0} \geq 0,15 \text{ (bifidogen)}$$

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird,

B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids
- sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Die erfindungsgemäßen Peptide wirken antimikrobiell gegen Bakterien, die in der natürlichen Säuglingsdarmflora nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen und fördern das Wachstum von erwünschten Bakterien wie Bifidobakterien, indem sie die Bifidobakterien im Wachstum stärker als andere Bakterien fördern oder nur die nichterwünschten Bakterien selektiv hemmen. Diese Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, wird als bifidogen bezeichnet.

Bevorzugt werden Peptide eingesetzt, die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:

R_1 -EQLLRLKK- R_2 , R_1 -YLEQLLRLKKY- R_2 , R_1 -NRQRNILR- R_2 ,
 R_1 -YMNGMNRQRNILR- R_2 , R_1 -FQWQRNMRK- R_2 , R_1 -HTGLRRTA- R_2 ,
 R_1 -FTAIQNLRK- R_2 , R_1 -EVAARARVW- R_2 , R_1 -WQRNMRKV- R_2 ,
 R_1 -LARTLKRLK- R_2 , R_1 -YKQKVEKV- R_2 , R_1 -LVRYTKKV- R_2 ,
 R_1 -KYLYEIARR- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVG- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVGE- R_2 ,
 R_3 -CIAL- R_4 R_3 -CIAL- R_4

R_1 -YQRRPAIAINNPYVPRTYYPANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWC^TVSQPEATKCFQWQRNMR^RVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKV^RGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKV^RGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -VYQHQA^KMPK^PWIQ^PKT^KVI^PY^RYL- R_2 , R_1 -ARRARVVWAAVG- R_2 ,
 R_1 -CAVGGGCIAL- R_2 ,
 R_1 -RHTRKYWC^RQ^GARGGCITL- R_2 .

worin

R_1 , R_3 unabhängig voneinander NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und
 R_2 , R_4 unabhängig voneinander $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Bevorzugt weisen R_1 , R_2 , R_3 , R_4 eine Länge von bis zu 50, mehr bevorzugt von bis zu 20 und am meisten bevorzugt eine Länge von bis zu 10 Aminosäuren auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch erhalten werden. Alternativ ist jedoch auch die Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder die Herstellung durch chemische Peptidsynthese möglich.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die Nukleinsäuren, die für die bifidogenen Bakterien kodieren, sowie Antikörper, die gegen bifidogene Peptide gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Nucleinsäuren können zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen in Arzneimitteln enthalten sein. Dazu werden bevorzugt galenische Zubereitungen eingesetzt und Applikationsformen gewählt, bei denen die Peptide undegradiert an den Wirkort gelangen.

Vorzugsweise wurden die erfindungsgemäßen Peptide in Mengen von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wirksame Nucleinsäuremengen sind beispielsweise 0,01 mg bis 100 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt liegt die Menge im Bereich von 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht für die Peptide und Nucleinsäuren.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zusammen mit Nährstoffen in Nahrungsmittel enthalten sein.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Peptide und/oder die gegen die Peptide gerichteten Antikörper zusammen mit weiteren Hilfsstoffen auch in Diagnostikmittel enthalten sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide und Nukleinsäuren eignen sich zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingte Erkrankungen wie Infektionen, Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies. Die mikrobielle Fehlbesiedlung kann beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien und/oder Plasmodien bedingt sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich auch als Hilfsstoff in der Nahrungsmittelzubereitung im Sinne von Fermentationshilfsstoffen.

Es wird insbesondere bevorzugt, daß zwei oder mehr Peptide gemeinsam eingesetzt werden oder Peptide eingesetzt werden, die zwei oder mehr der erfindungsgemäßen Peptidsequenzen aufweisen. Das unterschiedliche Wirkungsspektrum der Einzelstoffe bzw. Stoffe, die Einzelsequenzen oder erfindungsgemäße Peptide aufweisen, erlaubt es, beim Vorliegen von Resistenzen von Mikroorganismen durch eine geeignete Kombination von Sequenzen oder durch eine Kombination der Einzelsubstanzen eine optimale Hemmung der unerwünschten Mikroorganismen zu erzielen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern:

Beispiel 1

Behandlung von Milch

Humane Milch wurde mit Pepsin (20 mg/g Protein) versetzt, nachdem sie mit HCl auf einen pH von 3,5 eingestellt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und durch Kochen für fünf Minuten gestoppt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 60.000 g bei 4°C) und das MilCHFett abgeschöpft. Die verbliebene Lösung wurde mit 0,1 % TFA versetzt und erneut zentrifugiert, um ausgefallene hochmolekulare Proteine abzutrennen.

HPLC Reinigung eines bifidogenen Peptides aus Milch

Für die Reinigung von bifidogenen Peptiden aus Milch müssen verschiedene HPLC Trennverfahren miteinander kombiniert werden, um eine möglichst reine Darstellung über eine optimale Trennleistung zu erzielen und inaktive, unerwünschte Bestandteile abzutrennen. Die jeweiligen Proben, die nach jedem Trennungsschritt entstehen, müssen in zwei Testsystemen getestet werden, d.h. ein Wachstumstest mit Bifidobakterien in Kombination mit einem Wachstumstest mit E. coli als Target (siehe Beispiele 3 und 4). Notwendig für die Reinigung ist die Kombination von mindestens einem Reverse-Phase Chromatographieschritt (bevorzugt

von zwei Reverse-Phase Chromatographischritten) und der Einsatz einer Kationenaustausch-HPLC-Trennung. In den Biotest muß die jeweilige Probe salzarm eingesetzt werden, um ein möglichst optimales Screeningergebnis zu erhalten.

Der erste Trennschritt wurde mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12,5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 60% B in 45 Minuten

Fluß: 2 ml / min

Detektion 280 nm (siehe Figur 1)

Rechromatografie von Fraktion 23 mit der gleichen Säule und einem flacheren Gradient (siehe Bild):

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B : Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 20% B in 5 Minuten

20 bis 50% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 2)

Rechromatografie von Fraktion 16 aus dem vorangegangenen Trennschritt mit der gleichen Säule, aber anderem Elutionsmittel, um die Selektivität bei der Trennung zu verändern.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: 0,1% TFA in Methanol

Gradient: 0 bis 40% B in 5 Minuten

40 bis 70% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 3)

- 7 -

Rechromatografie der aktiven Fraktion 21 mit einer Kationenaustausch HPLC:

Säule: Parcosil Pepkat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek, Heidelberg

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer pH 4,5

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Fluß: 0,75 ml/min

Gradient: 0 bis 15% B in 5 Minuten

15 bis 50% B in 35 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 4)

Die erhaltenen Fraktionen wurden jede einzeln in einem kurzen Reverse Phase HPLC Lauf entsalzt, bevor sie zum Test auf antimikrobielle und bifidogene Aktivität zugeführt wurde.

Durch Massenspektrometrie und Aminosäuresequenzierung wurden die folgenden Peptide identifiziert:

Fraktion 9 enthielt die reine, bifidogene Komponente

YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF

(caseinK-63-117)

Fraktion 10 enthält die bifidogene Komponente

GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPICCIQA

(neutrophil-lactoferrin-20-67)

und Fraktion 11 enthält die bifidogene Komponente mit einer Adduktmasse von +16 was darauf hindeutet, daß es sich um ein Oxidationsprodukt handelt (vermutlich ist ein Methionin oxidiert).

Beide Peptide und das Oxidationsprodukt haben eine bifidogene Aktivität.

Beispiel 2

Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf E. coli

Fraktionen aus der HPLC wurden mit *E. coli* K12 eingesetzt. Der Test wird in 3 g/l Tryptic Soy broth (Sigma) folgendermaßen durchgeführt:

Für jeden Assay wurden Kulturen von *E. coli* K12 frisch in Tryptic Soy broth (Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Bestellnummer T8907) angeimpft (Difco Manual, 10th Ed., S. 1027). Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 16 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung, bestehend aus 200 µl 3 g/l Tryptic Soy broth, in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05, gemessen bei 500 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt.

Beispiel 3

Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf Bifidobacterium bifidum

Für jeden Assay wurden Kulturen von *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 frisch in Elliker broth (Difco, Detroit, USA) (Tryptone 20 g, Yeast Extract (Hefeextrakt) 5 g, Gelatin (Gelatine) 2,5 g, Dextrose 5 g, Lactose (Laktose) 5 g, Saccharose 5 g, Sodium Chloride (NaCl) 4 g, Sodium-Acetate (Natriumacetat) 1,5 g, Ascorbic Acid (Ascorbinsäure) 0,5 g) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter anaeroben Bedingung bei 37°C für 16 bis 18 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer

- 9 -

Testlösung bestehend aus 200 µl 50% Elliker broth in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05 gemessen bei 550 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISAREader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt. Als Positivkontrolle diente N-acetylglucosamin. Für diesen Test können nur Bifidus-Kulturen eingesetzt werden, die auf N-Acetylglucosamin reagieren. Nach einigen Passagen verlieren Bifidobakterien diese Eigenschaft, diese können dann für diesen Wachstumstest nicht mehr eingesetzt werden.

Beispiel 4

Als bifidogen wurden die Fraktionen identifiziert, bei denen der Wert

BW		EW		
--	-	--	≥	0,15 (bifidogen)
B0		E0		

ist.

Patentansprüche

1. Peptide erhältlich durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

BW		EW	
--	-	--	≥ 0,15 (bifidogen)
B0		E0	

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstoff-freien Kontrollinkubation erhalten wird.

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

- 11 -

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstoff-freien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phospho-rylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Frag-mente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

2. Peptide gemäß Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz

R_1 -EQLLRLKK- R_2 , R_1 -YLEQLLRLKKY- R_2 , R_1 -NRQRNILR- R_2 ,
 R_1 -YMNGMNRQRNILR- R_2 , R_1 -FQWQRNMRK- R_2 , R_1 -HTGLRRTA- R_2 ,
 R_1 -FTAIQNLRK- R_2 , R_1 -EVAARARVW- R_2 , R_1 -WQRNMRKV- R_2 ,
 R_1 -LARTLKRLK- R_2 , R_1 -YKQKVEKV- R_2 , R_1 -LVRYTKKV- R_2 ,
 R_1 -KYLVEIARR- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVG- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVGE- R_2 ,
 R_3 -CIAL- R_4 R_3 -CIAL- R_4

R_1 -YQRRPAIAINNPYVPRTTYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -VYQHQAAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL- R_2 , R_1 -ARRARVVWAAVG- R_2 ,
 R_1 -CAVGGGCIAL- R_2 ,
 R_1 -RHTRKYWCRQGARGGCITL- R_2 .

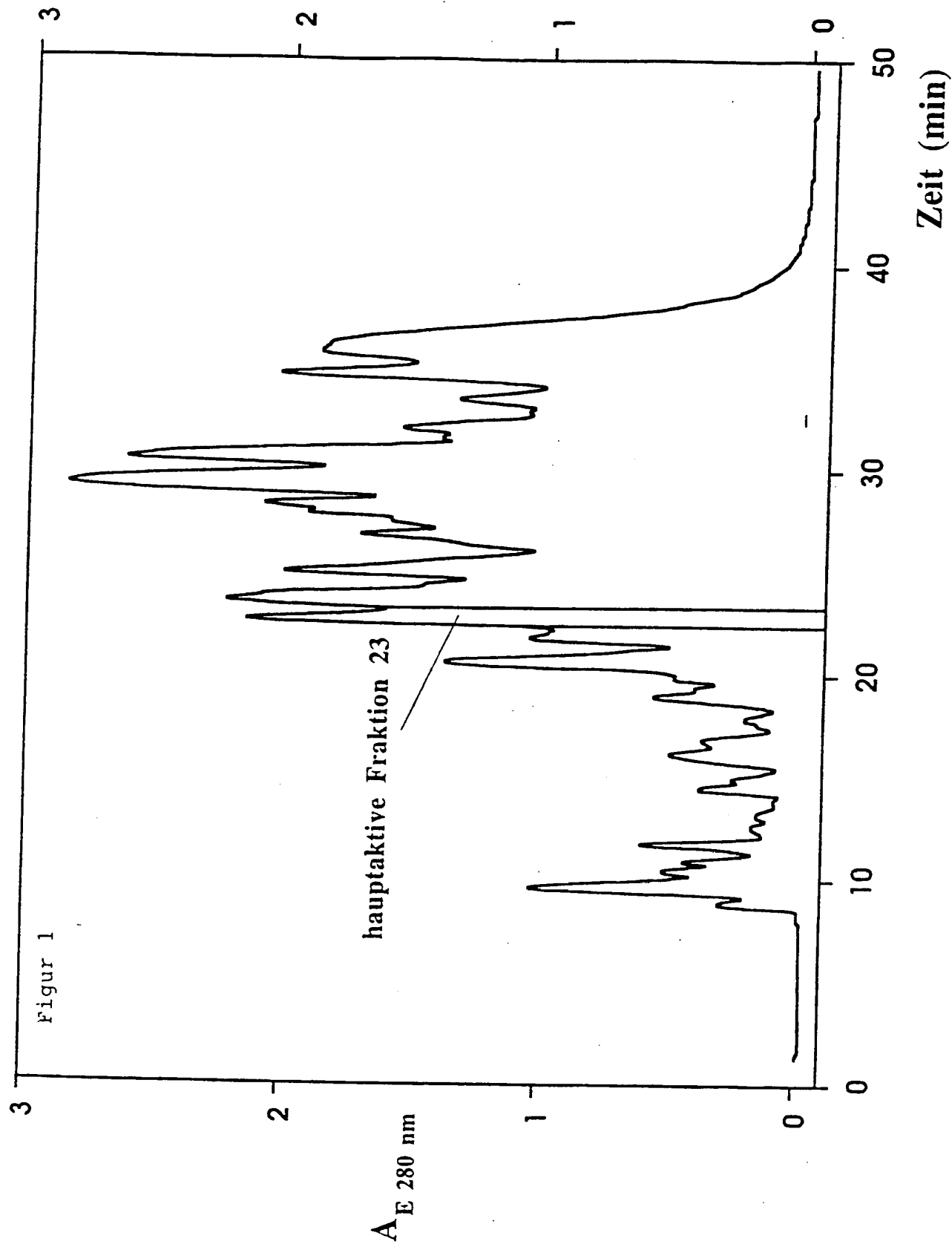
worin

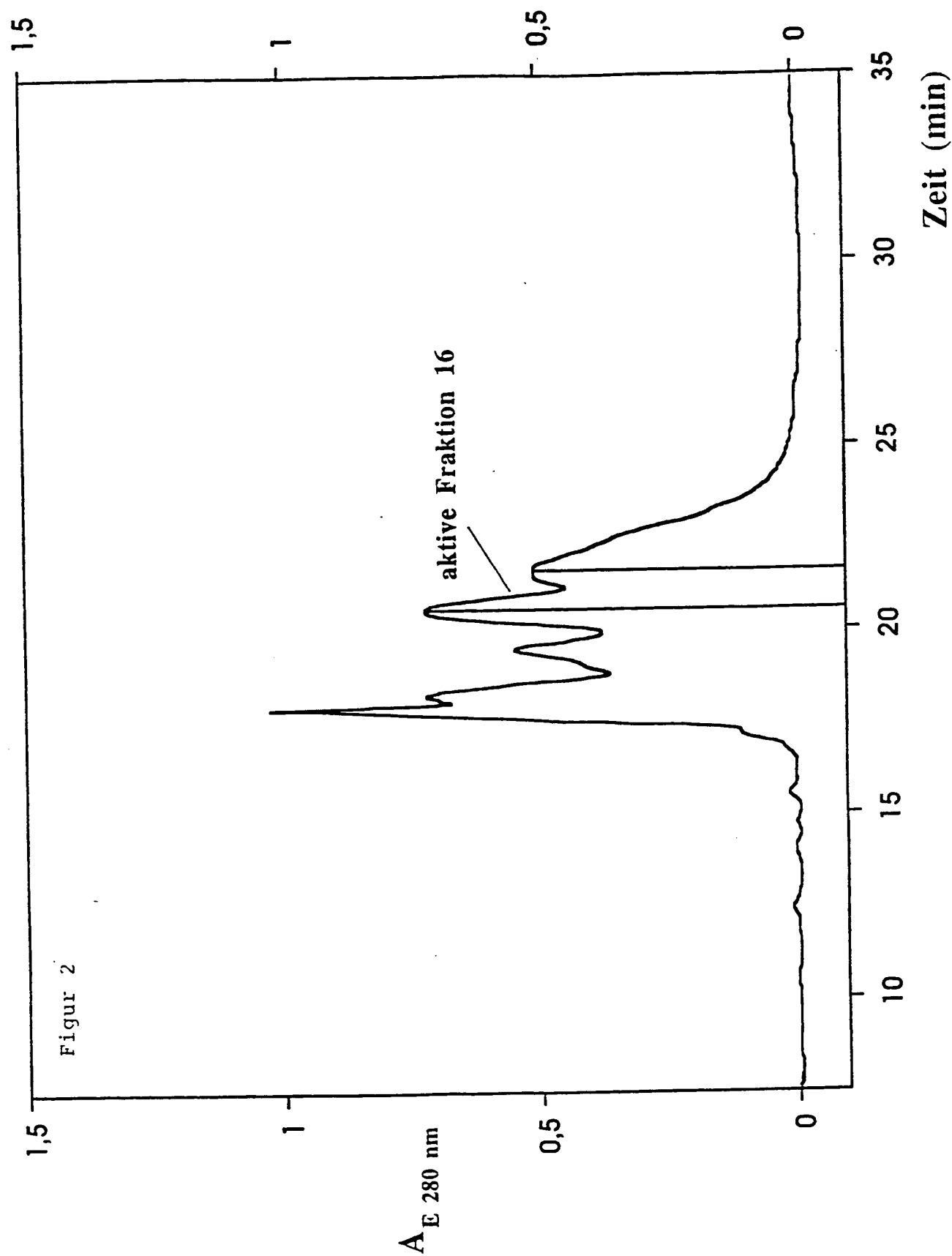
R_1 , R_3 unabhängig voneinander NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und

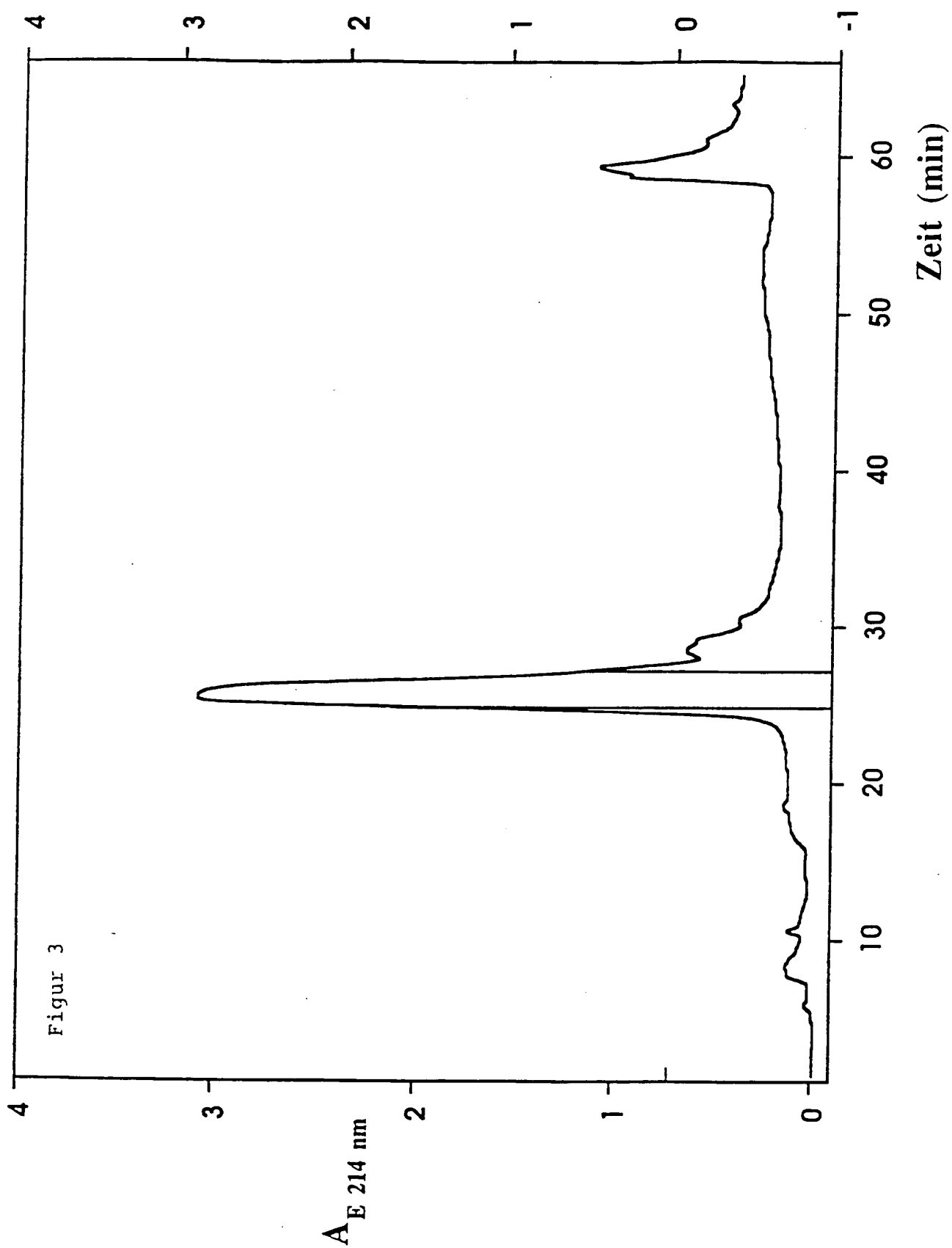
R_2 , R_4 unabhängig voneinander $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylier-ten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

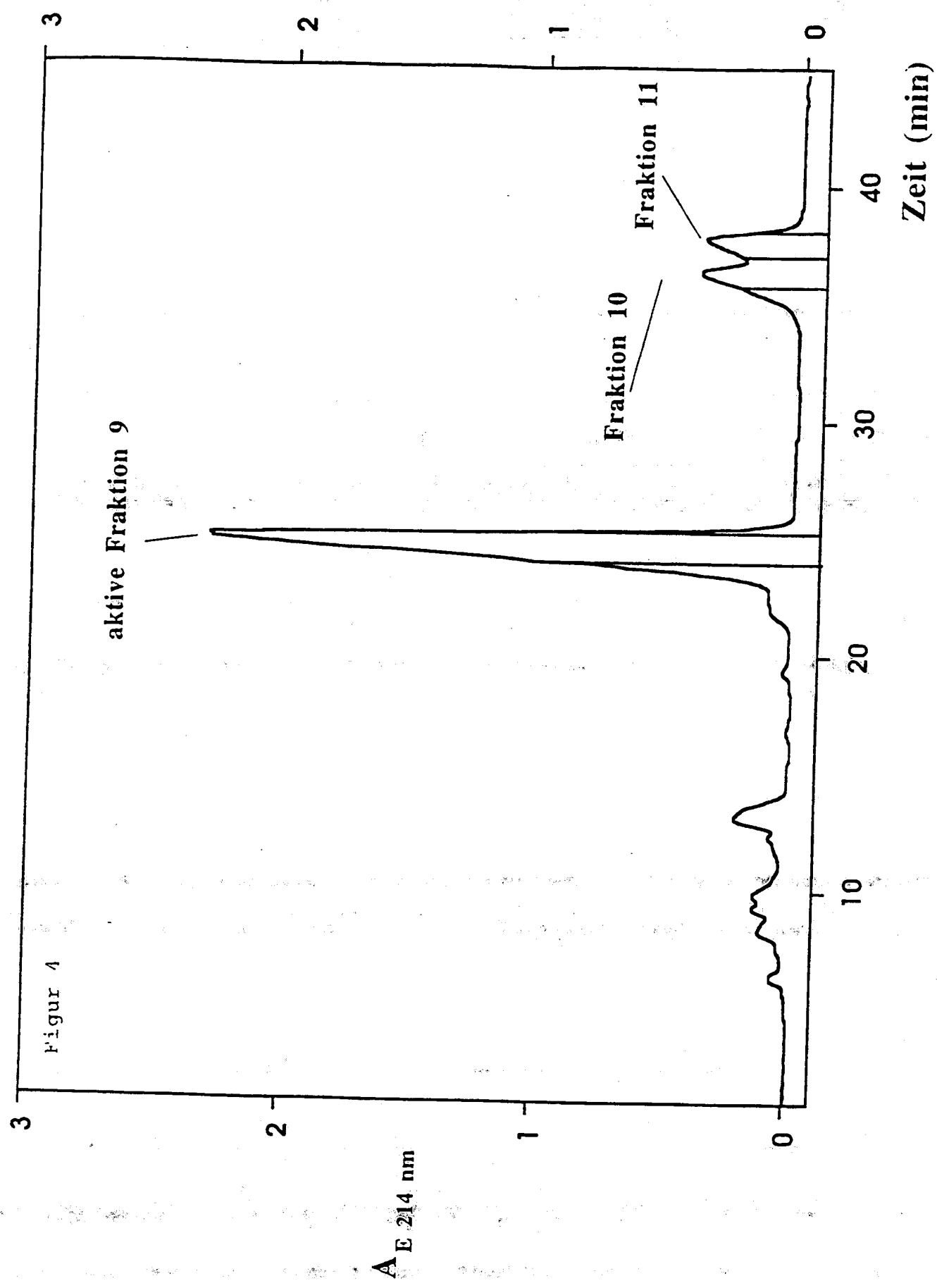
-12 -

3. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch, Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder chemische Synthese.
4. Nukleinsäuren kodierend für Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
5. Antikörper gerichtet gegen Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
6. Arzneimittel enthaltend mindestens eines der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder mindestens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen.
7. Nahrungsmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zusammen mit Nährstoffen.
8. Diagnostikmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 5 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
9. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder der Nucleinsäuren gemäß Anspruch 3 zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.
10. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zur Herstellung eines Nahrungsmittels.









SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Bifidogene Peptide

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 24

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Tyr Met Asn Gly Met Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

3

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Glu Val Ala Ala Arg Ala Arg Val Val Trp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

4

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Tyr Lys Gln Lys Val Glu Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Cys Ile Ala Leu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 55 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Tyr Gln Arg Arg Pro Ala Ile Ala Ile Asn Asn Pro Tyr Val Pro Arg
1 5 10 15
Thr Tyr Tyr Ala Asn Pro Ala Val Val Arg Pro His Ala Gln Ile Pro
20 25 30
Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Asn Ser His Pro Pro Thr Val Val Arg Arg
35 40 45
Pro Asn Leu His Pro Ser Phe
50 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Thr Val Ser Gln Pro Glu
1 5 10 15
Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg Val Arg Gly
20 25 30

6

Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro' Ile Gln Cys Ile Gln
 35 40 45
 Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Gly Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu Ala
 1 5 10 15
 Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln Ala
 35 40 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu
 1 5 10 15
 Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
 20 25 30
 Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln
 35 40 45
 Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

7

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Val	Tyr	Gln	His	Gln	Lys	Ala	Met	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Gln	Pro	Lys
1				5					10					15	
Thr	Lys	Val	Ile	Pro	Tyr	Val	Arg	Tyr	Leu						
			20					25							

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Ala	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Val	Trp	Ala	Ala	Val	Gly
1				5					10		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Cys	Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ile	Ala	Leu
1				5					10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Arg	His	Thr	Arg	Lys	Tyr	Trp	Cys	Arg	Gln	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Cys
1				5					10					15	
Ile	Thr	Leu													

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



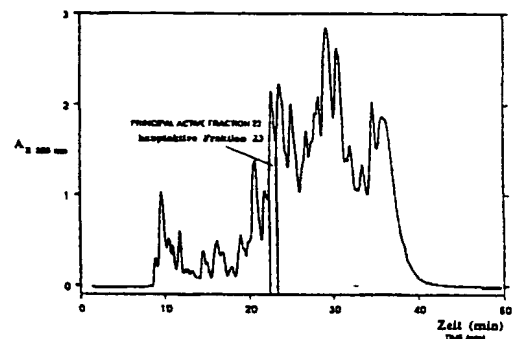
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/79, 14/47, 14/765, 14/705, C12N 9/36, A23L 1/305, C07K 5/103, 7/06, 16/04, C12N 15/12, G01N 33/68, A61K 38/07, 38/08, 38/17, 38/40, 38/38, 38/47</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/14231</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. März 1999 (25.03.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 40 604.1 16. September 1997 (16.09.97) DE 198 05 385.1 11. Februar 1998 (11.02.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 8. Juli 1999 (08.07.99)</p>	

(54) Title: BIFIDUS STIMULATING PEPTIDES AND ITS USES

(54) Bezeichnung: BIFIDOGENE PEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to peptides which are obtainable by mixing cow milk or human milk with proteases followed by a two hour incubation; centrifugation in order to remove milk fat; acidification to a pH of 2.0 by strong acidulation; separating the precipitated proteins; applying at least one reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) step; applying a cationic exchanger HPLC step; collecting fractions; adjusting the fractions to a salt content < 25 mM for executing an activity test by means of dialysis or reverse phase HPLC; cultivating bifidobacterium and e coli in the presence of the fractions and selection of fractions which satisfy condition $BW/B0 - EW/E0 \geq 0,15$, wherein BW denotes the bacterial count which is obtained during a 16-hour incubation of bifidobacterium in 50 % elliker broth in the presence of peptides in a concentration of 200 µg/ml, B0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation, EW denotes the bacterial count which is obtained during 16 hour incubation of e coli in 3 g/l tryptic soy broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml, E0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation; and isolating the available peptide in said fraction. In addition, the amidated, acetylated, sulphatized, phosphorylated, glycosylized, oxidized derivatives or fragments with bifidus stimulating characteristics and peptides are obtainable by combining the peptides, fragments or derivatives by means of chemical bonding.



(57) Zusammenfassung

Peptide erhältlich durch Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden, Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen, Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren, Abtrennung der ausgefallenen Proteine, Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes, Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes, Sammeln von Fraktionen, Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC, Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung: BW/B0 - EW/E0 ≥ 0,15 (bifid gen) genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50 % Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird, E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/05899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/79 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/705 C12N9/36
A23L1/305 C07K5/103 C07K7/06 C07K16/04 C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
X	AMETANI E.A.: "ANTIBODY RESPONSE OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MICE TO ALPHA-S1-CASEIN ANALYZED BY USING PROTEOLYTIC AND SYNTHETIC PEPTIDES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 154, No. 3, 15 August 1988, ORLANDO, FL US, Pages 876-882, XP002094248 See Table 1 and Fig. 1	1-3,8
X	SPUERGIN, P. ET AL: "Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG" ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY;ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249 See the whole document	1-3,5,8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999 (22.02.99)

Date of mailing of the international search report

24 May 1999 (24.05.99)

Name and mailing address of the ISA/

European patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/68 A61K38/07 A61K38/08 A61K38/17 A61K38/40
 A61K38/38 A61K38/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch. Week 9439 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-313708 XP002094254 & JP 06 239 888 A (KANEBO LTD) , 30.August 1994 See abstract</p>	1-3,7,10
X	<p>KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin" J. AGRIC. FOOD. CHEM., Vol 45, No. 5, May 1997 Pages 1579-1581, XP002094250 See the whole document</p>	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999 (22.02.99)

Date of mailing of the international search report

24 May 1999 (24.05.99)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
A	<p>BELLAMY E.A.: "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin" J.APPLIED BACTERIOLOGY, Vol. 73, No. 6, 1992, Pages 472-479, XP002094251 See the whole document</p>	1-10
A	<p>ETIENNE E.A.: "Growth promotion of Bifidobacterium animalis by bovine milk proteose-peptone" LAIT, Vol. 74, 1994, Pages 313-323, XP002094252 See the whole document</p>	1-10
A	<p>PROULX E.A.: "Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate reactions" LAIT, Vol. 74, 1994, Pages 139-152, XP002094253 See the whole document</p>	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP98/05899

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See ADDITIONAL MATTER
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See ADDITIONAL MATTER

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10 (in part)

Remark on Protest☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims Nos.: 1, 3-10 (in part)

Claim 1 of the application relates to peptides which are only defined as being obtainable by proteolysis of cow milk or human milk, by cleavage of peptide fractions and by selecting these fractions according to the property of being able to provide bifidus bacteria with a growth advantage.

There is no structural definition for each of these peptides.

For this reason a useful search could only include, apart from to the method of production, the peptides actually disclosed in the application. The search was therefore also limited to the peptides cited in Claim 2 and includes Claim 2 and Claims 3-10 in so far as they relate to Claim 2 (Article 17 (2) (a) (ii) PCT).

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1- 10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 1 or 2, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

2. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 3 or 4, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

3. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 5,9,18,19 or 20, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

4. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 6, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

5. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 7, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

6. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 8,14,16 or 22, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

7. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 10, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

8. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 11, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

9. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 12, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

10. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 13, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

11. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 15, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

12. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 17, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

13. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 21, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

14. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 24, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6	C07K14/79	C07K14/47	C07K14/765	C07K14/705	C12N9/36
	A23L1/305	C07K5/103	C07K7/06	C07K16/04	C12N15/12
	G01N33/68	A61K38/07	A61K38/08	A61K38/17	A61K38/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AMETANI E.A.: "ANTIBODY RESPONSE OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MICE TO ALPHA-S1-CASEIN ANALYZED BY USING PROTEOLYTIC AND SYNTHETIC PEPTIDES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 154, Nr. 3, 15. August 1988, ORLANDO, FL US, Seiten 876-882, XP002094248 See Table 1 and Fig.1 ---	1-3,8
X	SPUERGIN, P. ET AL: "Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG" ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY; ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249 siehe das ganze Dokument ---	1-3,5,8

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderschaftlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderschaftlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

* "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24 05 1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

GROENENDIJK, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 1, EP 98/05899

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K38/38 A61K38/47

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9439 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-313708 XP002094254 & JP 06 239 888 A (KANEBO LTD) , 30.August 1994 siehe Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,7,10
X	<p>KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin" J.AGRIC.FOOD.CHEM., Bd. 45, Nr. 5, Mai 1997, Seiten 1579-1581, XP002094250 siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

GROENENDIJK, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BELLAMY E.A.: "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin"</p> <p>J.APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 73, Nr. 6, 1992, Seiten 472-479, XP002094251 siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>ETIENNE E.A.: "Growth promotion of Bifidobacterium animalis by bovine milk proteose-peptone"</p> <p>LAIT, Bd. 74, 1994, Seiten 313-323, XP002094252 siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>PROULX E.A.: "Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate reactions"</p> <p>LAIT, Bd. 74, 1994, Seiten 139-152, XP002094253 siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05899

Feld I Bemerkung n zu den Ansprüch n, die sich als nicht recherchierbar erwies n haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

- ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Siehe WEITERE ANGABEN

- ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

- ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Siehe WEITERE ANGABEN

- ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
- ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
- ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
- ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

1-10 (partiell)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Ansprüche Nr.: 1,3-10 (teilweise)

Der Anspruch 1 der Anmeldung bezieht sich auf Peptide, welche nur dadurch definiert sind, dass sie erhältlich sind durch Proteolyse von Kuh- oder Humanmilch, Abspaltung von Peptidfraktionen und selektieren dieser Fraktionen auf die Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumvorteil zu verschaffen.

Es fehlt jede strukturelle Definition dieser Peptide.

Deswegen könnte eine zweckmässige Recherche neben dem Herstellungs-verfahren nur die tatsächlich in der Anmeldung offenbarten Peptide umfassen. Die Recherche hat sich denn auch beschränkt auf die in den Anspruch 2 genannten Peptide und umfasst Anspruch 2 und die Ansprüche 3-10 sofern sie sich auf Anspruch 2 beziehen (Art. 17(2)(a)(ii)PCT).

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 1 oder 2, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

2. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 3 oder 4, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

3. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 5,9,18,19 oder 20, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

4. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 6, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

5. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 7, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

6. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 8,14,16 oder 22, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper

und deren Verwendung

7. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 10, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

8. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 11, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

9. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 12, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

10. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 13, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

11. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 15 oder 23, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

12. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 17, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

13. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 21,
deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide,
Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und
Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper
und deren Verwendung

14. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 24,
deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide,
Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und
Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper
und deren Verwendung

